

(51)

Int. Cl.: C 07 d, 55/18

**FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY  
GERMAN PATENT OFFICE**

(52)

German Classification: 12 p, 10/05

(10)

(11) **Laid-Open Patent Application No. 2 105 456**

(21)

Reference Number: P 21 05 468.2

(22)

Application Date: February 5, 1971

(43)

Publication Date: November 18, 1971

Issuing Priority: ---

(30) Union Priority

(32) Date: April 23, 1970

(33) Country: Czechoslovakia

(31) Reference Number: 2830-70

---

(54) Title: Method for Preparing 1-Glycosyl-5-Acetosines

(61) Continuation of: --

(62) Withdrawal of: --

(71) Applicant: Czechoslovak Academy of Sciences, Prague

Represented in accordance with § 16 of the Patent Law by: Karsted, E.,  
Dipl. Ing. Dr., Patent Attorney, 4200 Oberhausen

(72) Named Inventor: Alois PISKALA; Frantishek SHORM; Prague

---

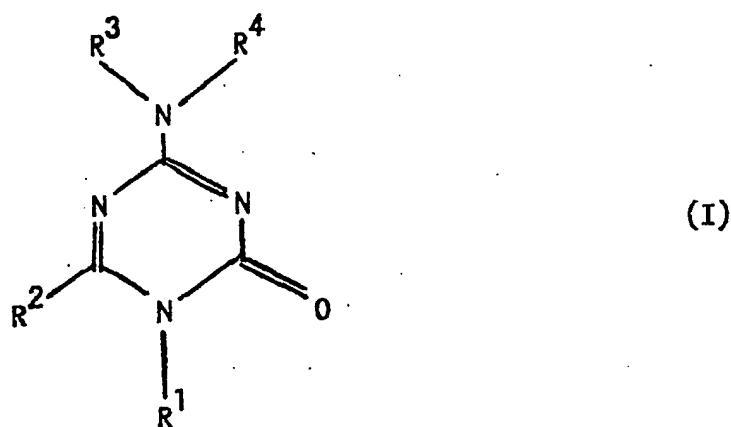
Notice given according to Art 7, § 1, Section 2, No. 1 of the Law of 9.4. 1967  
(BGBl. IS. 960): ---

PATENT APPLICATION

Applicant: Czechoslovak Academy of Sciences, Prague 1, Narodni Trida 3

“Method for Preparing 1-Glycosyl-5-Azacytosines”

The invention relates to a method for preparing 1-glycosyl-5-azacytosines according to General Formula I:



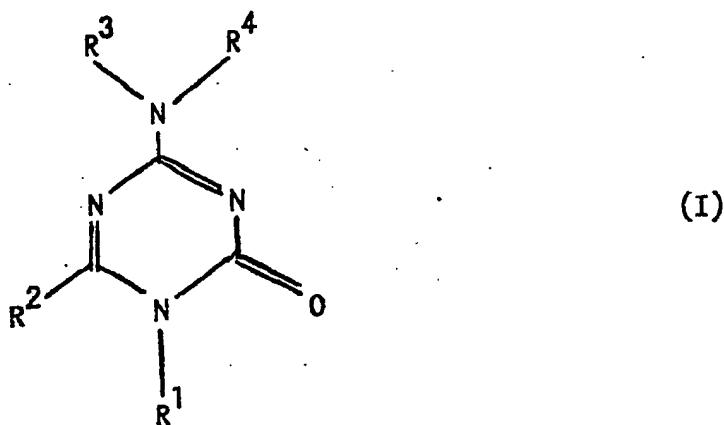
wherein R<sup>1</sup> is glycosyl, R<sup>2</sup> is a hydrogen atom or an alkyl having 1 to 4 carbon atoms and 3R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> – which can be the same or different items – designate hydrogen atoms, alkyls having 1 to 4 carbon atoms or aralkyls having 7 to 10 carbon atoms.

Two substances of the above names types, 1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-4-amino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine-2-on (5-azacytidine) and 1-(2-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-4-amino-1,2-dihydro-1,3,5-triazine-2-on (5-azo-2'-desoxycytidine) display a significant biological activity. Particularly remarkable are the antileukemic and radioprotective effects. That is why it is anticipated that some further biological activity of 1-glycosyl-5-acacytosine will be also displayed.

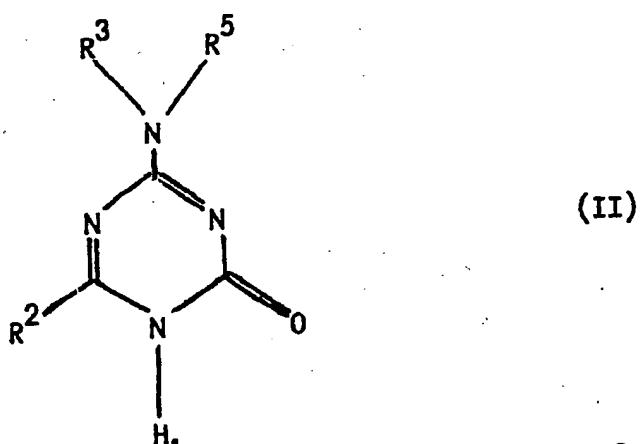
The preparation of 1-glycosyl-5-acacytosines is the subject of Czechoslovak patents No. 114,716, No. 116,297 and of patent applications PV 3399-69, PV 7708-68, PV 7718-68.

PATENT CLAIMS:

1. Method for preparing 1-glycosyl-5-azacytosines according to General Formula I:



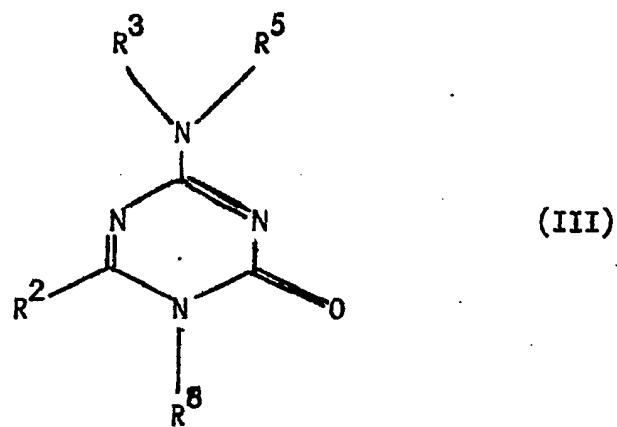
wherein R<sup>1</sup> is glycosyl, R<sup>2</sup> is a hydrogen atom or an alkyl having 1 to 4 carbon atoms and 3R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> – which can be the same or different items – designate hydrogen atoms, alkyls having 1 to 4 carbon atoms, characterized by the fact that N<sub>(4)</sub>-acyl-5-azacytosine according to General Formula II:



- 9 -

wherein R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> have the same meaning as in Formula I and R<sup>5</sup> represents an acyl having 1 to 4 carbon acid which is derived from an aliphatic acid, or an acyl having 7 to

10 carbon atoms which is derived from an aromatic acid, are trimethyl silylated and brought to reaction in an inert solvent with a peracyl halogenide, wherein 1-peracyl glycosyl N<sub>(4)</sub>-acyl-5-acazytosine is formed thereafter according to General Formula III:



in which R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> have the same meaning as in Formula I, and R<sup>5</sup> has the same meaning as in Formula II, and R<sup>6</sup> represents a peracyl glycosyl, subjected to alcoholysis or ammonolysis.

⑥ BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



⑥ Deutsche Kl.: 12 p, 10/05

⑥

⑩  
⑪  
⑫  
⑬  
⑭

## Offenlegungsschrift 2105468

Aktenzeichen: P 21 05 468.2

Anmeldetag: 5. Februar 1971

Offenlegungstag: 18. November 1971

Ausstellungsriorität: —

⑯  
⑰  
⑱  
⑲  
⑳

Unionspriorität

Datum: 23. April 1970

Land: Tschechoslowakei

Aktenzeichen: 2830-70

㉑

Bezeichnung: Verfahren zur Zubereitung von 1-Glykosyl-5-azacytosinen

㉒

Zusatz zu: —

㉓

Ausscheidung aus: —

㉔

Anmelder: Czeskoslovenska akademie ved, Prag

Vertreter gem. § 16 PatG: Karstedt, E., Dipl.-Ing. Dr., Patentanwalt, 4200 Oberhausen

㉕

Als Erfinder benannt: Piskala, Alois; Shorm, Frantishek; Prag

Benachrichtigung gemäß Art. 7 § 1 Abs. 2 Nr. 1 d. Ges. v. 4. 9. 1967 (BGBl. I S. 960): —

DT 2105468

3. Februar 1971

Anw.-Akte: 75.295

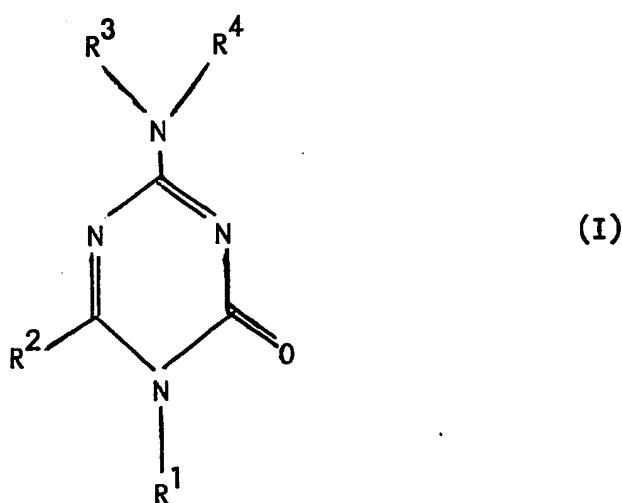
P A T E N T A N M E L D U N G

---

Anmelder: Československá akademie ved., Praha 1, Narodni tr. 3

"Verfahren zur Zubereitung von 1-Glykosyl-5-azacytosinen"

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Zubereitung von 1-Glykosyl-5-azacytosinen der allgemeinen Formel I



in welcher R<sup>1</sup> ein Glykosyl, R<sup>2</sup> einen Wasserstoffatom oder ein Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen und R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> - gleich oder verschiedenen - Wasserstoffatome, Alkyle mit 1 bis 4 Kohlenstoffatome oder Aralkyle mit 7 bis 10 Kohlenstoffatomen bedeuten.

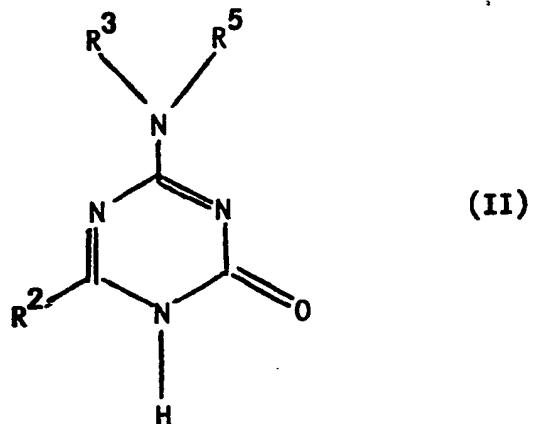
Zwei der Substanzen des vorangeführten Typs, das 1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl-4-amino-1,2-dihydro-1,3,5-triazin-2-on (das 5-Azacytidin) und das 1-(2-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-4-amino-1,2-dihydro-1,3,5-triazin-2-on (das 5-Aza-2'-desoxycytidin) weisen eine beträchtliche biologische Aktivität auf. Besonders bemerkenswert sind ihre anti-leukemischen und radioprotektiven Einwirkungen. Es ist deshalb die Vermutung angebracht, daß auch einige weitere 1-Glykosyl-5-azacytosine biologische Aktivität aufweisen werden.

Die Zubereitung von 1-Glykosyl-5-azacytosinen bildet den Gegenstand der tschechoslowakischen Patentschrift Nr. 114.716, Nr. 116.297 und der Patentanmeldungen PV 3399-68, PV 7708-68, PV 7718-68).

Diese Zubereitungsverfahren gehen von den gut zugänglichen Peracyl-glykosylisozyanaten aus, die durch Addition von O-Alkyl-isoharnstoffen, S-Alkylisothioharnstoffen, Guanidinen oder Acylguanidinen in die entsprechenden Isothiobiurete, Guanylharnstoffe oder Acylguanylharnstoffe überführt werden. Diese Verbindungen liefern dann durch Cyklokondensation mit Orthoestern niedrigerer aliphatischer Säuren, gegebenenfalls durch Cyklisierung die entsprechenden Alkoxy-, Alkylthio- oder Aminotriazinone. Aus diesen Zwischenprodukten können die 1-Glykosyl-5-azacytosine durch Transesterifikation oder Amminierung zubereitet werden. Die tschechoslowakische Patentschrift Nr. .... (Patentanmeldung PV 7718-68) befaßt sich sodann mit der direkten Glykosylierung des 5-Azacytosins unter Ausnutzung der Silylierungsmethode. Einen Nachteil dieses Verfahrens stellt die Tatsache dar, daß neben den 1-Glykosyl-5-azacytosinen auch 3-Glykosyl-5-azacytosine entstehen, die mit den Glykosylhalogeniden im weiteren zu 1,3-Di-

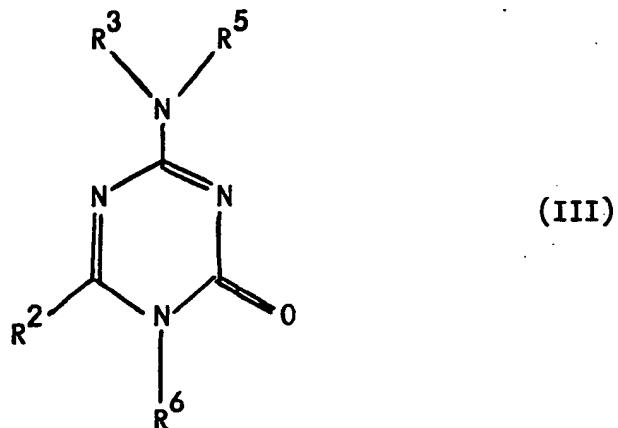
glykosyl-5-azacytosinen reagieren. Es wurde nunmehr festgestellt, daß die Bildung dieser unerwünschten Nebenprodukte durch Acylierung des 5-Azacytosins auf der Aminogruppe in Stellung 4 verhindert werden kann.  $N_{(4)}$ -Azacytosine werden hierbei ähnlich wie das 5-Azacytosin in ein Trimethylsilylderivat überführt, das sodann mit einem Peracylglykosylhalogenid - vorzugsweise in Anwesenheit von Quecksilber (II) - salzen in Acetonitrilmilieu - zur Reaktion gebracht wird. Die derart zubereiteten  $N_{(4)}$ -Acyl-1-per-acylglykosyl-5-azacytosine werden nachfolgend einer Alkoholyse oder einer Ammonolyse unterzogen.

Die gegenständliche Erfindung eines Verfahrens zur Zubereitung von 1-Glykosyl-5-azacytosinen der allgemeinen Formel I besteht in der Trimethylsilylierung von  $N_{(4)}$ -Acyl-5-azacytosinen der allgemeinen Formel II



in welcher  $R^2$  und  $R^3$  das gleiche wie in Formel I bedeuten und  $R^5$  ein von aliphatischen Säuren abgeleitetes Acyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen oder ein von aromatischen Säuren abgeleitetes Acyl mit 7 bis 10 Kohlenstoffatomen darstellt, und einer nachfolgenden Reak-

tion des rohen Trimethylsilyl- bzw. des bis -Trimethylsilylderivats mit einem Peracylglykosylhalogenid, die zur der Bildung des 1-Peracylglykosyl-N-N<sub>(4)</sub>-acyl-5-azacytosnis der allgemeinen Formel III



führt, in der R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> das gleiche wie in Formel I und R<sup>5</sup> das gleiche wie in Formel II bedeutet und R<sup>6</sup> ein Peracylglykosyl darstellt, wonach diese Verbindungen einer Alkoholyse oder einer Ammonolyse unterworfen werden.

Die Reaktion der Verbindung der allgemeinen Formel II mit dem Peracylglykosylhalogenid wird in einem inerten Lösungsmittel, z. B. in Benzol oder Toluol, mit Vorteil in Acetonitril, durchgeführt und kann durch Zugabe von Quecksilber (II)-salzen z.B. von Quecksilber(II)-oxid oder Quecksilber(II)-bromid, beschleunigt werden.

Die Alkoholyse der Verbindungen der allgemeinen Formel III wird in einem Alkanol mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen in Anwesenheit eines Alkoxids eines alkalischen Metalls, mit Vorteil mit Natriummethoxid in Methanol, verwirklicht.

Die Ammonolyse der Verbindungen der allgemeinen Formel III wird mit Ammoniak in einem Alkanol mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, mit Vorteil in Methanol, vollzogen.

Im folgenden wird die Erfindung durch einige Durchführungsbeispiele veranschaulicht, ohne sich hierbei auf diese zu beschränken.

Beispiel I

5- Azacytidin

Ein Gemisch aus 2,8 g 5-Azacytosin und 30 ml Acetanhydrid wird 30 Minuten lang in einem Metallbad (150°C) unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wird das kristallische Produkt abgesaugt, mit Äthylacetat durchwaschen und im Vakuum über Kaliumhydroxyd saugt, mit Äthylacetat durchwaschen und im Vakuum über Kaliumhydroxyd und über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet. Man gewinnt 2,90 g, d.h. 75 %, des N<sub>(4)</sub>-Acetyl-5-azacytosins, Smp. 237-238°C. Nach eventueller Schmelzung erstarrt die Verbindung neuerlich und ist nachfolgend bis zu 350°C schmelzfest.

Ein Gemisch aus 1,54 g N<sub>(4)</sub>-Acetyl-5-azacytosin, 6 ml Hexamethyl-disilazan und 2,0 ml Trimethylchlorsilan wird 4 Stunden lang unter Rückfluß zum Siedepunkt in einem Metallbad (150°C) erhitzt. Nach Abkühlung wird das Gemisch in einem Rotationsvakuumverdampfer (Badtemperatur 40°C) abgedampft und der Rest gründlich in 40 ml trockenen Toluols gemischt. Der unlösliche Rückstand wird dann rasch abfiltriert und das klare Filtrat neuerlich im Vakuum abgedampft. Das entstandene rohe bis-Trimethyl-silal-N<sub>(4)</sub>-5-azacytosin wird in 20 ml trockenen Acetonitrils gemischt und dem Gemisch 18 ml einer 0,5 M 2,3,5-Tri-O-benzoyl-D-ribofuranosyl-chloridlösung in Acetonitril, 1,8 g Quecksilber(II)-oxid und 1,8 g Quecksilber(II)-bromid zugesetzt. Unter

Ausschluß von Luftfeuchtigkeit wird dieses Gemisch 16 Stunden bei Zimmertemperatur mit einem Magnetrührwerk verrührt. Sodann erfolgt eine Verdünnung mit 100 ml Chloroform, der nicht lösliche Anteil wird abfiltriert, mit Chloroform durchwaschen und das Filtrat nach und nach mit 40 ml einer 30 %-igen Kaliumjodidlösung und 40 ml einer 5 %-igen Kaliumhydrogenkarbonatlösung ausgeschüttelt. Die Chloroformschicht wird im weiteren mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum (Badtemperatur 40°C) abgedampft. Der anfallende Sirup wird in 30 ml absoluten Methanols gelöst, worauf 9 ml einer 1 N NaOCH<sub>3</sub>-Lösung in Methanol zugesetzt werden. Das Gemisch wird gründlich bis zur völligen Auflösung verrührt und nachfolgend im verschlossenen Kolben vorerst 1 Stunde bei Zimmertemperatur und schließlich über Nacht bei 0°C stehen gelassen. Das abgeschiedene 5-Azacytidin wird abgesaugt, mit Methanol durchwaschen und in Vakuum einer Ölluftpumpe bei 100°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Man gewinnt 0,95 g, d. h. 43 %, des 5-Azacytidins mit einem Smp. von 234–236°C (unter Zerfall).

#### Beispiel 2

Das rohe, aus 1,54 g N'-(4)-Acetyl-5-azacytosin (s. Beispiel 1) zubereitete bis-Trimethylsilyl-N'-(4)-acetyl-5-azacytosin wird in 20 ml trockenen Acetonitrils eingemischt. Weiter wurden 18 ml einer 0,5 M 2,3,5-Tri-O-benzoyl-D-ribofuranosylchloridlösung in Acetonitril zugegeben und das Gemisch unter Luftausschluß magnetisch 3 Tage lang bei Zimmertemperatur verrührt. Sodann wird das Gemisch mit 100 ml Chloroform verdünnt, abfiltriert, die Lösung mit 50 ml einer 5 %-igen Kaliumhydrogenkarbonatlösung ausgeschüttet und nach Trocknung mit Natriumsulfat im Vakuum (Badtemperatur 40°C) getrocknet. Der anfallende Sirup wird in 30 ml einer 10 %-igen Lösung wasserfreien Ammoniums in abso-

lутем Метанол растворяется и остается под частым встряхиванием  
при комнатной температуре в закрытой колбе. Через 1 час  
решение оставляется на ночь при 0°C. Полученное вещество  
извлекается, сушится в вакууме с помощью масляного насоса  
при 100°C до постоянной массы. Получают 0,90 г, т.е. 41%  
5-Азакитидина, темп. 232-235°C (при разложении).

### Beispiel 3

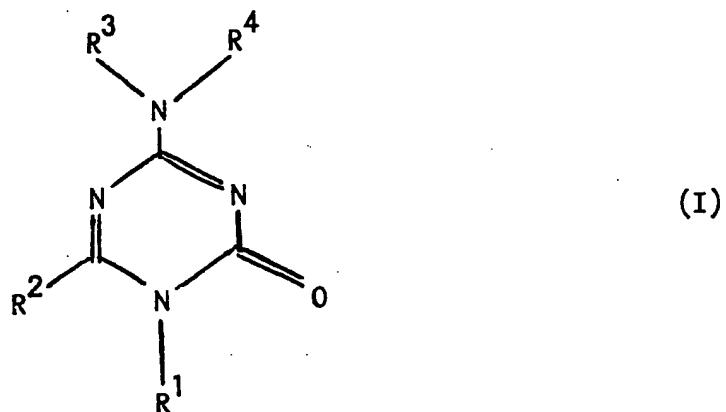
#### 1-(2-Desoxy- $\alpha$ -D-ribofuranosyl)-5-azacytosin

Das rohe aus 1,54 g N<sub>(4)</sub>-Acetyl-5-azacytosin (s. Beispiel 1) zubereitete  
bis -Trimethylsilyl-N<sub>(4)</sub>-acetyl-5-azacytosin wird in 40 ml trockenen  
Acetonitrils eingemischt. Weiter werden 3,5 g frisch zubereiteten  
3,5-di-O-p-Toluyl-2-desoxy-2-D-ribofuranosyl-chlorids zugegeben und  
das Gemisch magnetisch 3 Tage lang verrührt. Dem Gemisch wird sodann  
100 ml Chloroform zugesetzt, abfiltriert, die Lösung mit 50 ml einer  
5 %-igen Kaliumhydrogenkarbonatlösung ausgeschüttelt, mit Natriumsul-  
fat getrocknet und im Vakuum abgedampft. Der anfallende Sirup wird  
in 30 ml absolutem Methanols aufgelöst, danach wird 9 ml einer 1 N  
NaOCH<sub>3</sub>-Lösung in Methanol zugesetzt. Das Gemisch wird unter häufigem  
Umschütteln im geschlossenen Kolben vorerst bei Zimmertemperatur und  
nach erfolgter Auflösung und Impfung bei 1°C über Nacht stehen ge-  
lassen. Das abgeschiedene Produkt wird abgesaugt, mit Methanol durch-  
waschen und im Vakuum einer Ölluftpumpe getrocknet. Man gewinnt  
0,98 g, d. h. 48% des 1-(2-Desoxy- $\alpha$ -D-ribofuranosyl)-5-azacy-  
tosins, Smp. 176-178°C (unter Zerfall).

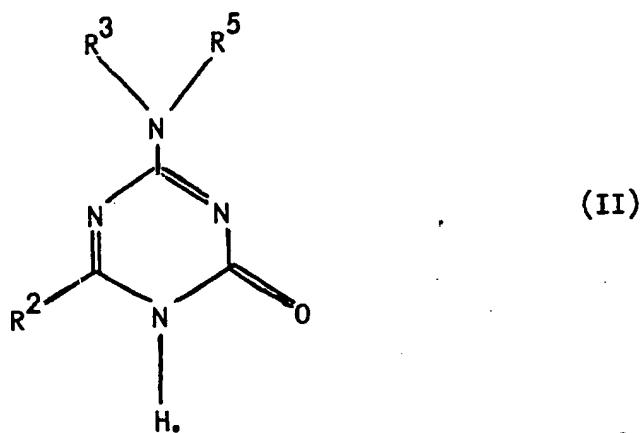
P A T E N T A N S P R Ü C H E :

---

1. Verfahren zur Zubereitung von 1-Glykosyl-5-azacytosinen der allgemeinen Formel I



in welcher R<sup>1</sup> ein Glykosyl, R<sup>2</sup> einen Wasserstoffatom oder ein Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen und R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> - gleich oder verschieden - Wasserstoffatome, Alkyle mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen bedeuten, dadurch gekennzeichnet, daß N<sub>(4)</sub>-Acyl-5-azacytosine der allgemeinen Formel II



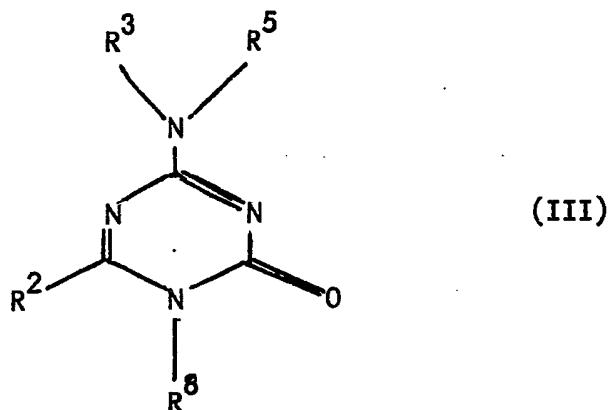
- 9 -

109847/1948

BEST AVAILABLE COPY

1000 BETHESDA, MD 20205

in welcher R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> das gleiche wie in Formel I bedeuten und R<sup>5</sup> ein vom aliphatischen Säuren abgeleitetes Acyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen oder ein von aromatischen Säuren abgeleitetes Acyl mit 7 bis 10 Kohlenstoffatomen darstellt, trimethylsilyliert und in einem inerten Lösungsmittel mit einem Peracylhalogenid zur Reaktion gebracht wird, wonach das entstandene 1-Peracylglykosyl N<sub>(4)</sub>-acyl-5-azacytosin der allgemeinen Formel III



in welcher R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> das gleiche wie in Formel I und R<sup>5</sup> das gleiche wie in Formel II bedeuten und R<sup>6</sup> ein Peracylglykosyl darstellt, einer Alkoholyse oder einer Ammonolyse unterworfen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als inertes Lösungsmittel Acetonitril, Benzol oder Toluol verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion der trimethylsilylierten Verbindung der allgemeinen Formel III mit dem Peracylglykosylhalogenid in Anwesenheit eines Quecksilber (II)-salzes, wie des Quecksilber(II)-oxids oder des Quecksilber(II)-bromids, durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Alkoholyse der Verbindungen der allgemeinen Formel III in einem Alkanol mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen in Anwesenheit eines Alkoxids eines alkalischen Metalls, mit Vorteil mit Natrium-methoxid in Methanol, durchgeführt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Ammonolyse der Verbindungen der allgemeinen Formel III mit Ammoniak in einem Alkanol mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise in Methanol, durchgeführt wird.

109847 1948

109847 1948

BEST AVAILABLE COPY -

BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**